

Ana - Marija Berić

Optimiziranje metode za određivanje koncentracije cinka u ljudskom urinu

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju *Analitička kemija 2* Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Jasne Jablan.

Željela bih se zahvaliti svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasni Jablan koja mi je pri izradi ovog diplomskog rada pokazala iznimnu susretljivost, pružila nesebičnu pomoć i omogućila ugodnu radnu atmosferu. Također se želim zahvaliti svojim prijateljima Edvinu, Hani, Jeleni i Saneli te svojoj obitelji bez kojih sve ovo ne bi bilo moguće.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Cink	2
1.1.1. Biološka uloga cinka u ljudskom organizmu	2
1.1.2. Poremećaji cinka	3
1.1.3. Homeostatski model	4
1.1.4. Nutritivni izvori cinka	5
1.2. Atomska apsorpcijska spektrofotometrija (AAS)	6
1.2.1. Dijelovi AAS-a	7
1.3. Validacija analitičke metode	10
1.3.1. Preciznost	10
1.3.2. Specifičnost i selektivnost	11
1.3.3. Osjetljivost	11
1.3.4. Linearnost i radno područje	12
1.3.5. Točnost	12
1.3.6. Izdržljivost	12
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	16
3.1.1. Korištene kemikalije	16
3.1.2. Aparatura	16
3.1.3. Laboratorijski pribor	17
3.1.4. Uzorci	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Princip metode	18
3.2.2. Priprema otopina	18
3.2.3 Postupak određivanja koncentracije cinka	20
3.2.4. Statistička obrada podataka	20
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. Validacija analitičke metode	22
4.1.1. Linearnost	22
4.1.2. Preciznost	23
4.1.3. Točnost	26

4.1.4. Osjetljivost.....	27
4.2. Primjena optimizirane metode.....	27
5. ZAKLJUČAK.....	28
6. LITERATURA.....	30
7. SAŽETAK/SUMMARY.....	33
7.1. Sažetak.....	34
7.2. Summary.....	35
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	
BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Cink

1.1.1. Biološka uloga cinka u ljudskom organizmu

Cink je esencijalni metal za normalnu funkciju ljudskog organizma. Kao takav, uključen je u brojne aspekte staničnog metabolizma. Procijenjeno je da oko 10 % ljudskih proteina potencijalno vežu cink, uz stotine onih koji ga transportiraju. Potreban je za katalitičku aktivnost više od 200 enzima te sudjeluje u brojnim fiziološkim procesima tijela (Osredkar i Sustar, 2011).

U tijelu nalazimo 2 do 4 grama cinka pri čemu je većina u mozgu, kostima, bubrezima i jetri, s najvećim koncentracijama u prostati te dijelovima oka. On je drugi najzastupljeniji prijelazni metal u organizmu nakon željeza i jedini metal koji se pojavljuje u svim enzimskim porodicama. Igra važnu ulogu u funkciji imunološkog sustava, zacijeljivanju rana, sintezi proteina, sintezi DNA i staničnom dijeljenju. Također je potreban za normalan osjet okusa i mirisa te za normalan rast i razvoj tijekom trudnoće, djetinjstva i adolescencije (Osredkar i Sustar, 2011).

Dokazano je da cink ima antioksidativna svojstva, a njegova uloga u oksidativnom stresu usko je povezana s bakrom. Naime, disbalans njihovog omjera (Cu/Zn) povećava oksidativni stres, a on izravno utječe na starenje i o godinama ovisne degenerativne bolesti kao što su ateroskleroza, Alzheimerova bolest, koronarna bolest srca i slično. Cink antagonizira prooksidativno djelovanje bakra i zato je važno da budu u odgovarajućem omjeru. Mehanizam antioksidativnog djelovanja cinka je takav da on štiti merkaptoskupine od oksidacije i sprječava prijelazne metale u stvaranju hidroksilnih i superoksidnih radikala (Mezzetti i sur., 1998). Studije su također pokazale da je omjer bakra i cinka povezan s poremećajima u prehrani, upalnim procesima te disfunkcijom imunološkog sustava (Guo i sur., 2011).

Stanice u žlijezdama slinovnicama, prostati, imunološkom sustavu i probavnom sustavu koriste signalizaciju cinkom kao način komunikacije s drugim stanicama. U mozgu je cink pohranjen u specifičnim sinaptičkim vezikulama glutamatergičnih neurona te može modulirati ekscitabilnost mozga. Igra ključnu ulogu u plastičnosti neurona, a samim time i u procesu učenja. Međutim, cink može biti i neurotoksin što upućuje na važnost homeostaze cinka u normalnoj funkciji mozga i cjelokupnog središnjeg živčanog sustava (Osredkar i Sustar, 2011).

U plazmi je cink vezan i transportiran preko albumina (60 %) i transferina (10 %). Pošto se transferinom prenosi i željezo, povećano željezo može smanjiti apsorpciju cinka, i obrnuto. Cink može biti pohranjen u metalotioneinskim rezervama, a metalotionein u stanicama gastrointestinalnog trakta može prilagođavati apsorpciju cinka između 15 i 40 % ovisno o tome što je još prisutno u gastrointestinalnom traktu. Primjerice, prisutnost glukoze povećava apsorpciju. Također, povećani unos cinka narušava apsorpciju bakra jer metalotionein apsorbira oba metala. Međutim, koncentracije cinka u krvnoj plazmi ostaju relativno konstantne bez obzira na njegov unos (Jurowski i sur., 2014; Osredkar i Sustar, 2011).

1.1.2. Poremećaji cinka

Ljudsko tijelo ima razrađeni sustav za regulaciju količine esencijalnih metala u tragovima u krvi te u samim stanicama. Kada taj sustav zakaže, mogu se javiti poremećaji u koncentracijama istih. Jedan od najčešćih disbalansa je povišena koncentracija bakra i snižena koncentracija cinka. Omjer koncentracija ovih dvaju metala klinički je značajniji od njihovih pojedinih koncentracija. Kako je cink drugi najzastupljeniji prijelazni metal u organizmu nakon željeza, može se zaključiti koliko je važno održavati njegove optimalne koncentracije u tijelu (Osredkar i Sustar, 2011; WHO, 2001).

Deficijencija cinka je karakterizirana poremećajima rasta, gubitkom apetita i narušenom funkcijom imunološkog sustava. U težim slučajevima može se javiti gubitak kose, proljev, odgođeno seksualno sazrijevanje, neplodnost, hipogonadizam kod muškaraca te lezije oka i kože. Također se mogu pojaviti gubitak težine, otežano zacijeljivanje rana, promjene u okusu i poremećena kognicija (Hambidge, 2000).

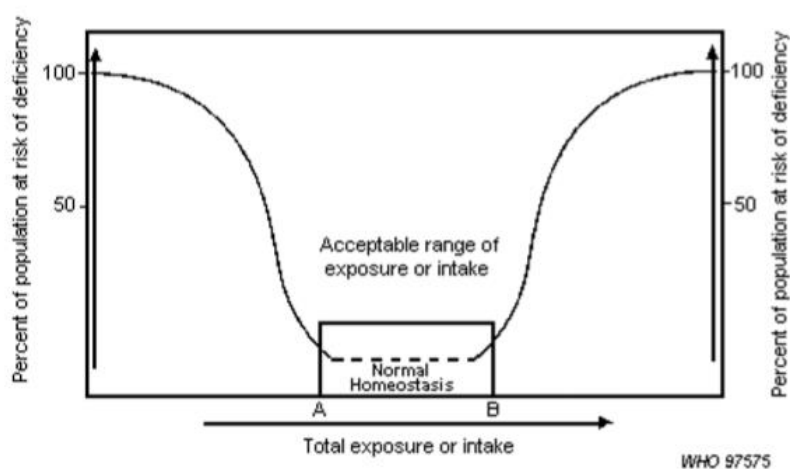
Pojava deficijencije obično je posljedica nedovoljnog unosa ili apsorpcije cinka, povećanih gubitaka ili povećanih potreba za cinkom. Također može biti povezana i s bolestima kao što su kronična bolest jetre ili bubrega, enteropatski akrodermatitis, srpasta anemija, dijabetes i druge kronične bolesti. Grupe ljudi koje su pod povećanim rizikom deficijencije cinka su trudnice i dojilje, dojenčad koja je hranjena isključivo dojenjem, osobe s gastrointestinalnim poremećajima, vegetarijanci te oboljeli od srpaste anemije, proljeva ili alkoholizma (Osredkar i Sustar, 2011; WHO, 2001).

Iako cink jest esencijalan za dobro zdravlje, pretjerane količine mogu biti štetne. Simptomi akutnog trovanja uključuju mučninu, povraćanje, gubitak apetita, abdominalne grčeve, proljev i glavobolje. Jedan slučaj navodi tešku mučninu i povraćanje 30 minuta nakon

ingestije 4 grama cinkovog glukonata (Lewis i Kokan, 1998). Unos od 150 do 450 miligrama cinka dnevno povezuje se s kroničnim učincima kao što su niski status bakra, promijenjena funkcija željeza, smanjeni imunološki odgovor i smanjenje razina lipoproteina visoke gustoće. Smanjene razine superoksidne dismutaze, koja je marker statusa bakra, pojavljuju se čak i nakon umjereno visokih unosa cinka od 60 miligrama dnevno tijekom 10 tjedana (Osredkar i Sustar, 2011; Prashanth i sur., 2018).

1.1.3. Homeostatski model

Odnos između unosa cinka i njegovih optimalnih koncentracija, odnosno deficijencije i toksičnosti, opisan je homeostatskim modelom koji ima oblik U-krivulje. "Ruke" krivulje izražavaju rizik deficijencije ili viška, dok se ostatak krivulje odnosi na izloženost, tj. unos, koji je potreban za optimalnu fiziološku funkciju – zdravlje. Na Slici 1. vidimo kako unos pada ispod točke A, rizik za deficijenciju raste. Na ekstremno niskim izloženostima ili unosima svi subjekti manifestirat će deficijenciju. Kako izloženost ili unos rastu preko točke B, progresivno veći broj subjekata manifestirat će učinke toksičnosti. Područje između A i B je normalna homeostaza (engl. *Normal homeostasis*). Na vezu između unosa i zdravlja utječu fiziološki faktori (homeostaza) i ekstinzični faktori koji utječu na dostupnost cinka za apsorpciju i iskorištavanje ili koji interferiraju s metabolizmom cinka i biokemijskim procesima u kojima je cink potreban. U prirodi ti odnosi nisu nužno simetrični (WHO, 2001).



Slika 1. Krivulja ovisnosti postotka populacije u riziku od deficijencije (engl. *Percent of population at risk of deficiency*) o ukupnoj izloženosti ili unosu (engl. *Total exposure or intake*). (WHO, 2001)

Homeostatski model definira princip prihvatljivog opsega izloženosti za esencijalne elemente u tragovima kao što je cink. U prihvatljivom opsegu, cink koji je potreban za brojne metaboličke i fiziološke procese, pruža podlogu za ekspresiju genetskog potencijala individualca, kao što su primjerice optimalan rast, zdravlje, reprodukcija i razvoj. Unos cinka u prihvatljivim količinama ne proizvodi neželjene učinke među općom populacijom; međutim, postoje individualci ili skupine ljudi s disbalansima u metalima u tragovima ili s poremećajima u homeostatskim mehanizmima istih, kojima se uz unos u prihvatljivim količinama događaju deficijencija ili toksičnost (WHO, 2001).

1.1.4. Nutritivni izvori cinka

Procijenjeni prosječni unos cinka hranom iznosi od 5,6 do 13 miligrama dnevno u novorođenčadi i djece od 2 mjeseca do 19 godina, a za odrasle od 20 do 50 godina od 8,8 do 14,4 miligrama dnevno. Meso, riba i morski plodovi su bogati izvori bioraspoloživog cinka, dok su voće i povrće relativno slabo opskrbljeni. Kod osoba koje konzumiraju meso, više od jedne trećine cinka dolazi iz mesa, dok je kod vegetarijanaca izvor biljna hrana. Cink možemo unesti i vodom, ali to su vrlo male količine (manje od 0,2 miligrama dnevno). Konzumacija dodataka prehrani s cinkom, kao i terapija lijekovima koji sadrže cink, mogu rezultirati visokom izloženosti cinku (WHO, 2001).

Apsorpcija cinka iz čvrste hrane je uglavnom u rasponu manje od 15 % do 55 %, ovisno o sastavu prehrane, nutritivnim vrijednostima, fiziološkim potrebama i zdravstvenom statusu pojedinca. Kada su kao glavni prehrambeni izvori cinka nerafinirane žitarice, orašasti plodovi i leguminoze, apsorpcija je slaba, ponajviše zbog prisutnosti fitata koji smanjuju njegovu apsorpciju, a u manjoj mjeri zbog Maillardovih produkata i prehrambenih vlakana (WHO, 2001).

1.2. Atomsko apsorpcijska spektrofotometrija (AAS)

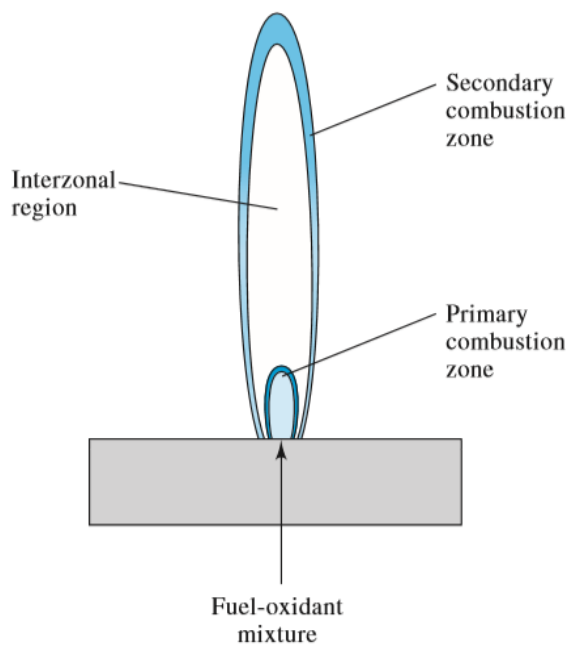
Atomsko apsorpcijska spektrofotometrija je najčešće korištena analitička tehnika za određivanje metala u uzorcima. Metali koji se analiziraju apsorbiraju zračenje određene valne duljine pri čemu dolazi do ekscitacije na razini elektrona te njihovog prelaska na više energetske razine (Jignesh i sur., 2012). Apsorbirat će se zračenje iz vanjskog izvora one energije koja odgovara razlici između osnovnog i pobuđenog stanja atoma ili iona. Za isti elektronski prijelaz, energija emitiranog fotona ekvivalentna je energiji apsorbiranog, odnosno valna duljina emitiranog jednaka je valnoj duljini apsorbiranog zračenja (Skoog i Leary, 1992).

Ovakav tip analize vrši se u plinovitoj sredini, uz ultraljubičasto i vidljivo zračenje, pa je zato prvi, i ključni, korak procesa - atomizacija. To je postupak kojim se vodena otopina uzorka fino raspršuje i isparava, pri čemu nastaje atomska para. Stvaranje atomske pare može se postići plamenom, elektrotermički i u induktivno spregnutoj plazmi. Učinkovitost i reproducibilnost atomizacije naročito je važna jer određuje osjetljivost, preciznost i točnost metode (Skoog i sur., 1999). Plamena atomizacija temelji se na unošenju fino raspršene vodene otopine pomiješane s plinovitim gorivom i oksidansom u plamen. Plamen se sastoji od osnovnog područja, unutrašnjeg i vanjskog stošca. Otapalo isparava u prvom, osnovnom, području koje je tik uz plamenik. Isparavanjem otapala dobivamo fino raspodijeljene čvrste čestice koje ulaze u središnji dio plamena – unutrašnji stožac, u kojem je temperatura najviša. Tu čvrste čestice prelaze u plinovite i elementarne atome te se uspostavlja ravnoteža između atoma, iona i elektrona pošto svi elementi u plamenu ioniziraju do nekog stupnja. Položaj te ravnoteže ovisi o temperaturi plamena, ukupnoj koncentraciji ispitivanog metala i koncentraciji elektrona nastalih ionizacijom svih elemenata koji su prisutni u uzorku. Važno je naglasiti da se ionski i atomski spektar iste specije razlikuju i zato je potreban nadzor temperature (Skoog i sur., 1999).

Za dobivanje plamena najčešće se koristi smjesa zraka i acetilena čime se mogu postići temperature oko 2400 °C (Watson, 1999). Uzorak velikom brzinom prolazi kroz plamen i zbog toga samo dio uzorka prolazi kroz opisani proces. Iz tog razloga plamen nije izrazito djelotvoran za atomizaciju (Skoog i sur., 1999). Kao ograničenje plamene atomizacije smatra se i činjenica da nije moguće analizirati čvrste uzorke bez prethodnog otapanja (Watson, 1999).

Prednost AAS-a je brzina provođenja analize, jednostavnost, relativno niske cijene

instrumenata te povoljna osjetljivost i selektivnost za mnoge elemente. Ograničenja su poteškoće kod istovremenog određivanja više elemenata zbog toga što je za svaki element potrebna odgovarajuća lampa sa šupljom katodom (Jignesh i sur., 2012; Skoog i sur. 1999; Kirkbright 1980).



Slika 2. Dijelovi plamena: osnovno područje (engl. *Primary combustion zone*), unutrašnji stožac (engl. *Interzonal region*) i vanjski stožac (engl. *Secondary combustion zone*) (Watson, 1999)

1.2.1. Dijelovi AAS-a

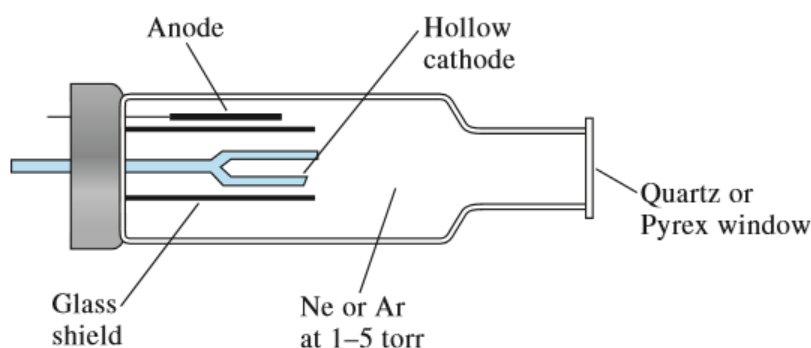
Linijski izvor zračenja

Kao linijski izvor zračenja u atomsko apsorpcijskoj spektrofotometriji najčešće se koristi žarulja sa šupljom katodom. Sastoji se od zataljene staklene cijevi punjene inernim plinom pod tlakom od 100-600 kPa u kojoj se nalaze volframova anoda i cilindrična katoda. Katoda je ili presvučena metalom koji se analizira ili je načinjena od istog (Skoog i sur., 1999).

Na elektrode se primjenjuje potencijal od oko 300 V što dovodi do ionizacije inernog plina (primjerice argona) i nastanka struje jačine između 5 i 10 mA (jednadžba 1):



Kada se postigne dovoljno velik potencijal, kationi argona udaranjem na katodu imaju dovoljnu energiju za izbijanje određenog broja atoma s površine. Taj proces naziva se prštanje (Jignesh i sur., 2012). Dio tih izbijenih atoma nalazi se u pobuđenom stanju, a pri povratku u osnovno stanje, emitiraju karakteristične valne duljine koje su potrebne za pobuđivanje atoma u ispitivanom uzorku. Izbijeni atomi mogu se vratiti natrag na površinu katode ili se istaložiti na stijenke žarulje (Skoog i sur., 1999).



Slika 3. Dijelovi linijskog izvora zračenja: anoda (engl. *Anode*), šuplja katoda (engl. *Hollow cathode*), stakleni štit (engl. *Glass shield*), inertni plin neon (Ne) ili argon (Ar), prozor od kvarca ili borosilikatnog stakla(engl. *Quartz or Pyrex window*)

Plameni atomizator laminarnog protoka

Kao generator atomske pare, u današnjim uređajima za AAS, koristi se plamenik laminarnog protoka ili plamenik s prethodnim miješanjem. U prošlosti je u primjeni bio plamenik turbulentnog protoka, ali je zamijenjen laminarnim zbog brojnih prednosti potonjeg (Skoog i sur., 1999).

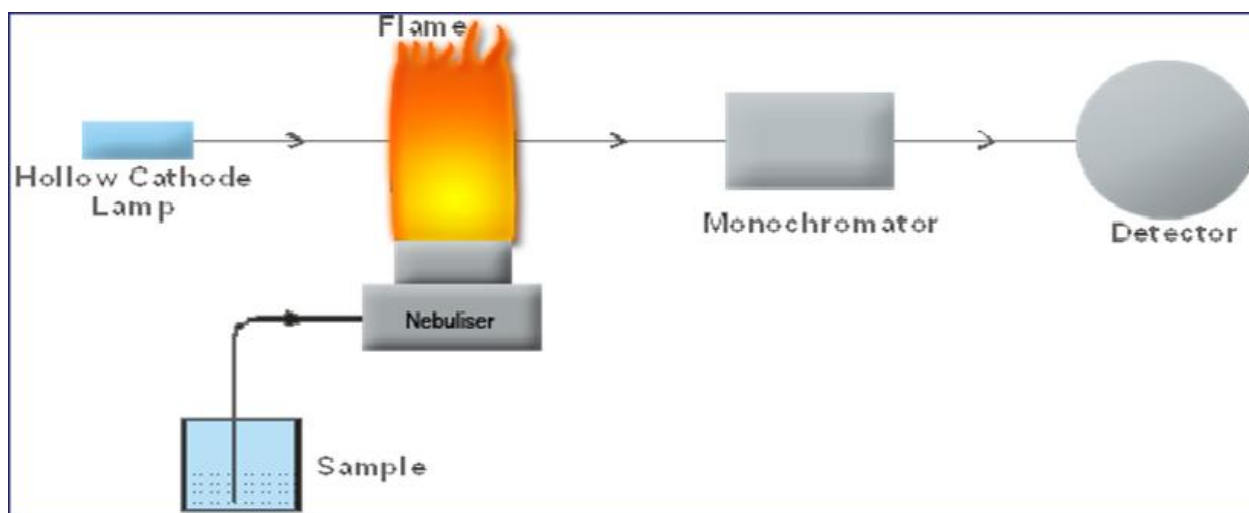
U plameniku laminarnog protoka uzorak se rasprši uz protok oksidansa pokraj kapilarnog vrška, a zatim se miješa s gorivom i prolazeći kroz niz zapreka uklanja se sve osim najsitnijih kapljica. Tako dobivene kapljice ulaze u plamenik dužine 5 do 10 centimetara (Skoog i sur., 1999).

Prednosti ovakvih plamenika su mnogo veća duljina puta plamena i njegova relativna tihoća. Također, zbog tih svojstava, imaju dobru reproducibilnost i osjetljivost, a problem začepjenja pojavljuje se vrlo rijetko (Skoog i sur., 1999).

Nedostaci su manja brzina unošenja uzorka, selektivno isparavanje miješanih otapala u komori, što može dovesti do analitičkih pogrešaka, te može doći do uskakanja plamena (Skoog i sur., 1999; Watson, 1999).

Spektrofotometar

Spektrofotometar je najčešće izveden pomoću monokromatora i fotodetektora. Svjetlost plamena prolazi kroz monokromator koji propušta zračenje točno određene valne duljine do detektora. Procesor signala u detektoru odvaja izmjenični signal žarulje i istosmjerni signal plamena. Dobivena vrijednost apsorbancije rezultat je logaritma omjera referentne komponente i komponente uzorka (Skoog i sur., 1999).



Slika 4. Dijelovi AAS-a: izvor zračenja (engl. *Hollow Cathode Lamp*) generator atomske pare (engl. *Nebuliser*), monokromator i detektor (www.lab-training.com)

1.3. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak kojim se ispituje i zabilježava prikladnost ispitivane metode za određenu primjenu. Pri tome se dobivenim podacima garantira da će se u propisanim uvjetima dobiti valjani rezultati (Nigović i sur., 2014).

Postupak validacije potrebno je provesti kod uvođenja nove metode ili pri promjeni nekog segmenta postojeće, a obuhvaća sljedeće analitičke značajke: preciznost, specifičnost/selektivnost, osjetljivost, linearnost i radno područje, točnost te izdržljivost. Međutim, za neku metodu nije potrebno ispitivati sve navedene značajke. Odabir parametara ovisi o samoj namjeni metode (Ata i sur., 2014; Nigović i sur., 2014).

1.3.1. Preciznost

Preciznost označava slaganje niza ponovljenih mjerenja koja se dobivaju višestrukim uzorkovanjem istog uzorka pri propisanim uvjetima. Izražava se kao ponovljivost, srednja preciznost i obnovljivost. Ponovljivost ili preciznost u seriji (engl. *repeatability*) je poklapanje rezultata izmjerenih pod istim uvjetima, istom metodom, u kratkom vremenskom razdoblju. U mjerenjima sudjeluje isti analitičar s istim reagensima i instrumentom. Srednja preciznost ili preciznost iz dana u dan (engl. *intermediate precision*) prikazuje koliko rezultati odstupaju ako se mjerenje vrši pod različitim uvjetima istog laboratorija kroz dulje vremensko razdoblje; dakle, različiti dani, analitičari te instrumenti. I naposljetku, obnovljivost (engl. *reproducibility*) koja označava odstupanja dobivena mjerenjem u različitim laboratorijima (Ata i sur., 2014; Nigović i sur., 2014).

Preciznost se izražava preko relativne standardne devijacije (RSD, %) prema formuli (2):

$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je SD standardna devijacija, a \bar{x} srednja vrijednost dobivenih rezultata. Za dobivanje rezultata potrebno je pet do šest mjerenja uzorka u dvije do tri različite koncentracije (Nigović i sur., 2014).

1.3.2. Specifičnost i selektivnost

Specifičnost je sposobnost analitičke metode da se njome može razlikovati samo jedna komponenta u uzorku. Takve metode nalaze se rijetko, pa zato češće govorimo o selektivnosti, tj. sposobnosti metode da odredi željeni analit u smjesi komponenata uzorka koji uključuju matricu, onečišćenja, pomoćne tvari i slično. Za neku metodu specifičnost, odnosno selektivnost, određuju se tako da se uzorku čistog analita dodaju onečišćenja ili, ako onečišćenja nisu dostupna, uzorak se podvrgava uvjetima pri kojima dolazi do razgradnje (Nigović i sur., 2014).

1.3.3. Osjetljivost

Osjetljivost se izražava preko granice dokazivanja i granice određivanja. Granica dokazivanja (engl. *Limit of detection*, LOD) je najniža koncentracija analita u uzorku koja se može dokazati pri zadanim uvjetima, ali ne odrediti. Izračunava se prema jednadžbi (3):

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad (3)$$

gdje je σ standardno odstupanje rezultata odgovarajućeg broja mjerenja signala slijepog uzorka, tj. standardno odstupanje regresijskog pravca ili standardno odstupanje y-odsječka regresijskog pravca, a a je nagib kalibracijskog pravca (Nigović i sur., 2014).

Granica određivanja (engl. *Limit of quantitation*, LOQ) je najniža koncentracija analita u uzorku pri kojoj se on može odrediti s prihvatljivom točnošću i preciznošću, pri zadanim uvjetima. Izračunava se prema jednadžbi (4):

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \quad (4)$$

Vrijednosti LOD i LOQ, osim preko navedenih jednadžbi (3) i (4), mogu se dobiti i određivanjem omjera signal/šum tako da se otopine standarda razrijede do vrijednosti omjera signal/šum 10 za granicu određivanja, a 3 za granicu detekcije (Nigović i sur., 2014; Skoog i Leary, 1992).

1.3.4. Linearnost i radno područje

Linearnost je sposobnost analitičke metode da u određenom intervalu daje rezultate koji su izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Određujemo je kroz tri do šest mjerenja s najmanje pet različitih koncentracija analita. Rezultati mjerenja prikazuju se grafički kao kalibracijska krivulja ovisnosti izmjerenog signala o koncentraciji. Linearnost se izražava koeficijentom korelacije regresijskog pravca koji treba biti veći od 0,999.

Radno područje je raspon između donje i gornje koncentracije analita u uzorku (u obzir se uzimaju i granične vrijednosti) unutar kojeg metoda ima odgovarajuću linearnost, točnost i preciznost (Nigović i sur., 2014).

1.3.5. Točnost

Točnost analitičke metode jest podudaranje srednje vrijednosti dobivenih vrijednosti sa stvarnim ili prihvaćenim referentnim vrijednostima. Da bi se utvrdila točnost potrebna su najmanje tri mjerenja uzorka u najmanje tri različite koncentracije unutar radnog područja metode. Točnost najčešće iskazujemo preko analitičkog prinosa (engl. *recovery*) prema jednadžbi (5):

$$R = \frac{\chi}{X} \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je χ srednja izmjerena vrijednost, a X je stvarna vrijednost analita u uzorku (Nigović i sur., 2014).

1.3.6. Izdržljivost

Izdržljivost ili otpornost je mjera sposobnosti analitičke metode da ostane u nepromijenjenom stanju pri izloženosti malim, namjernim, promjenama parametara. Otpornost nam ukazuje koliko je zaista metoda pouzdana s obzirom na činjenicu da u realnim uvjetima izvođenja možemo očekivati promjene uvjeta. Određuje se tako da se jedan parametar mijenja, uz ostale nepromijenjene, a koji parametar će se izabrati ovisi o samoj metodi (Ata i sur., 2014; Nigović i sur., 2014).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Brojni minerali i elementi u tragovima važni su za normalno funkcioniranje ljudskog organizma. Cink je, kao jedan od njih, važan za brojne fiziološke funkcije kao sastavni dio više od 200 enzima. Nužan je za normalan rad živčanog, koštanog i imunološkog sustava, normalno funkcioniranje bubrega, jetre, očiju i prostate te brojnih drugih organa (Osredkar i Sustar, 2011).

Razine minerala i metala u tragovima mogu se promijeniti kao rezultat adaptivnih mehanizama tijekom fizički zahtjevnih sportova, kao što je primjetice trčanje ultra maratona (Jablan i sur. 2012). Metoda za određivanje cinka u urinu potencijalno je važna za proučavanje kako tijelo funkcionira tijekom velike fizičke aktivnosti pošto tijekom takvih napora dolazi do povećanja cirkulacije, povećanja metabolizma i promjene razine elektrolita u organizmu (Tang i sur., 2016). Razine minerala i metala u tragovima mijenjaju se u cirkulaciji i urinu nakon sportske aktivnosti, ali nije točno poznato kako do toga dolazi (Jablan i sur., 2012).

Cilj ovog diplomskog rada je optimizirati analitičku metodu koja će pouzdano u uzorcima urina odrediti koncentraciju cinka. Tehnika korištena za određivanje koncentracije je atomska apsorpcijska spektrofotometrija. Metoda je validirana pripremom standarda cinka koji su služili izradi kalibracijskog pravca, određivanju preciznosti (ponovljivosti) i određivanju LOD i LOQ. Točnost metode određena je primjenom referentnog standardnog materijala. Nakon validacije, metoda je primjenjena na uzorcima urina ultramaratonaca prikupljenim neposredno prije utrke.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

- Zn-standard za AAS 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma Aldrich, Njemačka)
- standardni referentni materijal Human Multi-Sera Level 3 i Level 2 (Randox, Crumlin, UK)
- HNO_3 65% (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Ultračista voda (provodljivost $0,055 \mu\text{Scm}^{-1}$)

Sve kemikalije korištene za razvoj metode bile su *pro analysi* čistoće.

3.1.2. Aparatura

Analiza je provedena pomoću atomske apsorpcijske spektrofotometre Analyst 800 (Perkin Elmer Instruments, Norwalk, CT, SAD) s deuterijskim korektom nespecifične površine prema parametrima:

- Žarulja: žarulja sa šupljom katodom (15mA)
- Valna duljina (nm): 213,9 nm
- Gorivo / oksidans: acetilen / zrak
- Acetilen (tlak (Pa) /protok ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$): $0,9 \times 10^5/2$
- Zrak (tlak (Pa) /protok ($\text{dm}^3 \text{min}^{-1}$): $5,5 \times 10^5/17$
- Širina pukotine (nm): 0,7
- Fotodetektor
- Korekcija nespecifične apsorpcijske pozadine: deuterijski korektor
- Pisač, računalno: AA Winlab 32 Software, Dell OptiPlex GX270, računalno+monitor+printer HP 5652

3.1.3. Laboratorijski pribor

- Staklene epruvete od 10,00 mL
- Staklene čaše od 50 mL
- Odmjerne tikvice od 25,00 mL i 100,00 mL
- Kapaljke
- Mikropipete od 50-200 μ L, 200-1000 μ L, 1000-10000 μ L

3.1.4. Uzorci

Kao uzorak korišten je urin sakupljen od zdravih dobrovoljaca sudionika ultramaratona neposredno prije utrke. Uzorci su iz 2016. godine i čuvani su u hladnjaku na temperaturi od -20 °C.

3.2. Metode

3.2.1. Princip metode

Koncentracija cinka određena je mjerenjem apsorbancije ispitivanog uzroka koji se raspršivao u smjesi zraka i oksidansa, a potom izgorio u plamenu pri čemu je došlo do atomizacije. Dobiveni atomi ozračili su se zračenjem valne duljine 213,9 nm i pratila se promjena intenziteta zračenja (Williams, 1972).

3.2.2. Priprema otopina

2% HNO_3

2%-tna otopina HNO_3 pripremljena je razrjeđivanjem 10,00 mL 65 %-tne otopine HNO_3 s ultračistom vodom u odmjernoj tikvici od 500,00 mL.

Standardne otopine cinka

Matična standardna otopina cinka koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ pripremljena je iz komercijalno pripremljene otopine cinka koncentracije 1000 $\mu\text{g/mL}$ tako da se 1,00 mL komercijalne otopine razrijedi vodom u odmjernoj tikvici od 100,00 mL. 0,125 mL pripremljene matične otopine cinka koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ razrijedi se u odmjernoj tikvici od 25,00 mL i tako je dobivena otopina ST1 koncentracije 0,05 mg/L. Za izradu kalibracijskog pravca korištene su standardne otopine različitih koncentracija pripremljene razrjeđivanjem matične otopine u odmjernim tikvicama volumena 25,00 mL. Standardne otopine cinka pripremljene su kako je prikazano u Tablici 1.:

Tablica 1. Koncentracije i priprema standardnih otopina cinka

Koncentracija standarda cinka (mg/L)	Priprema standarda	Ukupno razrijeđenje u odnosu na matičnu otopinu
0,05 (ST1)	125 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	200×
0,1 (ST2)	250 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	100×
0,2 (ST3)	500 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	50×
0,4 (ST4)	1000 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	25×
0,6 (ST5)	1500 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	16,67×
0,8 (ST6)	2000 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	12,5×
1 (ST7)	2500 μ L matične otopine konc. 10 mg/L se nadopuni ultračistom vodom do 25,00 mL	10×

3.2.3. Postupak određivanja koncentracije cinka

Uzorak se pripremi za mjerenje tako da se uzme 400 μL uzorka urina u staklenu epruvetu i doda 1600 μL pročišćene vode te promiješa. Slijepu probu čini ultračista voda koja ne sadrži uzorak. Plameni atomizator potrebno je prethodno pročititi, a to se čini pomoću 2% HNO_3 na početku i na kraju mjerenja, a između pojedinih mjerenja za ispiranje koristi se ultračista voda.

Nakon pripreme i homogenizacije slijedi mjerenje uzoraka. Uređaj omogućuje višestruko uzastopno mjerenje istog uzorka u kratkom vremenskom periodu što doprinosi većoj točnosti mjerenja. Koncentraciju cinka u uzorku određuje se preko izmjerene apsorbanije pri valnoj duljini od 213,9 nm koja je proporcionalna koncentraciji.

Koncentracije cinka u uzorcima urina izračunate su pomoću kalibracijske krivulje i izražene u mg/L .

3.2.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu dobivenih rezultata korišten je računalni program Microsoft Excel 2016, programskog paketa Microsoft Office (Microsoft, SAD) i Prism GraphPad (Graph pad Software, Inc., San Diego, SAD, www.graphpad.com).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija analitičke metode

Validacija analitičke metode je postupak za utvrđivanje prikladnosti ispitivane metode za određenu primjenu pri čemu dobiveni podaci jamče da će u propisanim uvjetima ispitivana metoda dati valjane rezultate.

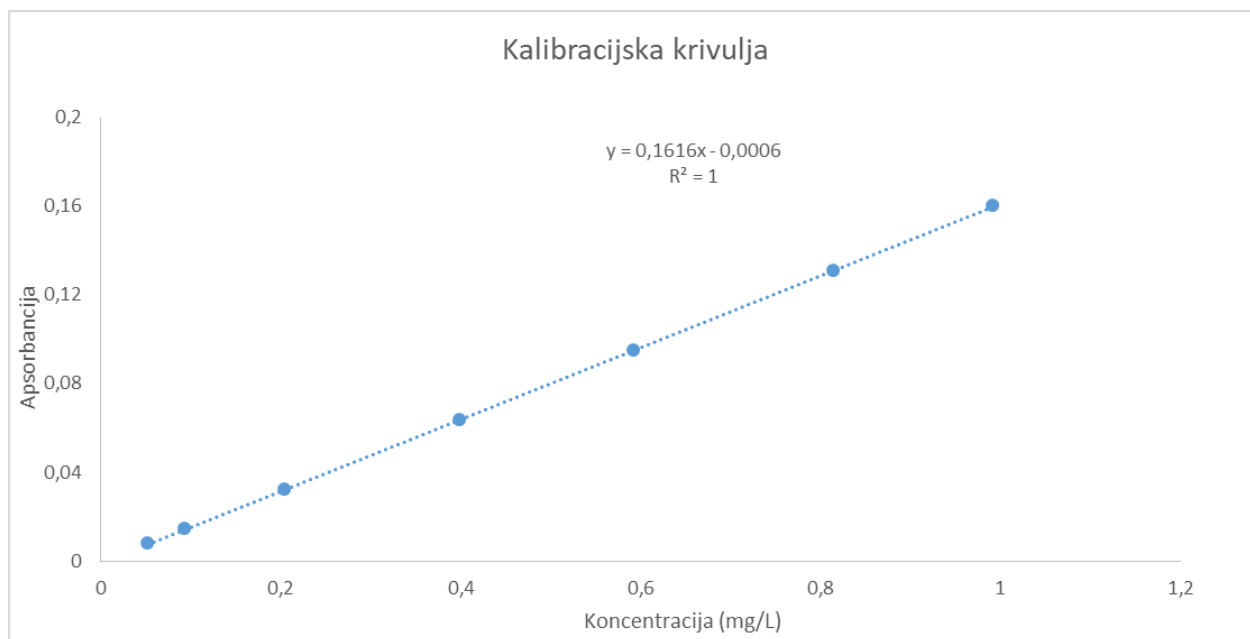
Za potrebe ispitivanja linearnosti, preciznosti, točnosti, granice dokazivanja i granice određivanja korišteni su slijepa proba te pripremljeni standardi i uzorci (Nigović i sur., 2014).

4.1.1. Linearnost

Za utvrđivanje linearnosti ispitivane metode korištene su standardne otopine različitih koncentracija, a za svaki standard koncentracija je mjerena u tri uzastopna ponavljanja. Iz dobivenih rezultata prikazanih u Tablici 2 načinjen je graf ovisnosti odaziva detektora prikazan kao apsorbancija o koncentraciji standarda (Slika 5), a čija jednačba pravca glasi $y=0,1616x-0,0006$ s koeficijentom korelacije $R^2=1$. Na temelju vrijednosti koeficijenta korelacije zaključeno je da je metoda linearna te da ju je moguće primijeniti za određivanje koncentracije cinka u uzorcima gdje je njegova koncentracija nepoznata.

Tablica 2. Vrijednosti koncentracija standardnih otopina cinka i dobivenih apsorbancija

C_{Zn}[mg/L]	Apsorbancija
0,052	0,0081
0,094	0,0148
0,204	0,0323
0,399	0,0635
0,593	0,0947
0,815	0,1310
0,992	0,1602



Slika 5. Kalibracijska krivulja ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda cinka

4.1.2. Preciznost

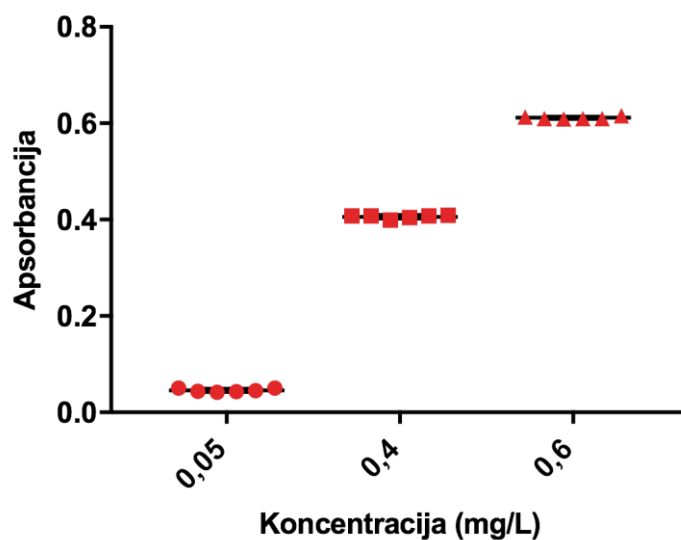
Za određivanje preciznosti potrebno je izvršiti pet do šest mjerenja u dvije do tri različite koncentracije uzorka. Rezultati se iskazuju kao relativna standardna devijacija, a računaju prema jednadžbi (2). Preciznost se može iskazati kao ponovljivost koja uključuje mjerenje u kratkom vremenskom razdoblju, srednja preciznost koja uključuje mjerenje kroz dulje vremensko razdoblje i obnovljivost koja uključuje mjerenje u različitim laboratorijima.

Za validaciju ove metode utvrđene su ponovljivost i srednja preciznost. Ponovljivost se utvrdila provođenjem šest mjerenja za tri standarda u kraćem vremenskom periodu. Rezultati su prikazani u Tablici 3. i grafički Slika 6.

Tablica 3. Izmjerene koncentracije za tri standarda cinka unutar istog dana

BROJ MJERENJA	ST1 (0,05mg/L)	ST4 (0,4 mg/L)	ST5 (0,6 mg/L)
1.	0,043	0,399	0,610
2.	0,042	0,408	0,609
3.	0,050	0,409	0,610
4.	0,050	0,408	0,613
5.	0,044	0,404	0,610
6.	0,045	0,408	0,616
Srednja vrijednost (\bar{x})	0,0457	0,406	0,611
Standardna devijacija (SD)	0,0035	0,0039	0,0027
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	7,6695	0,9476	0,4348

Prihvatljiva relativna standardna devijacija (RSD, %) za ponovljivost je do 2 %.



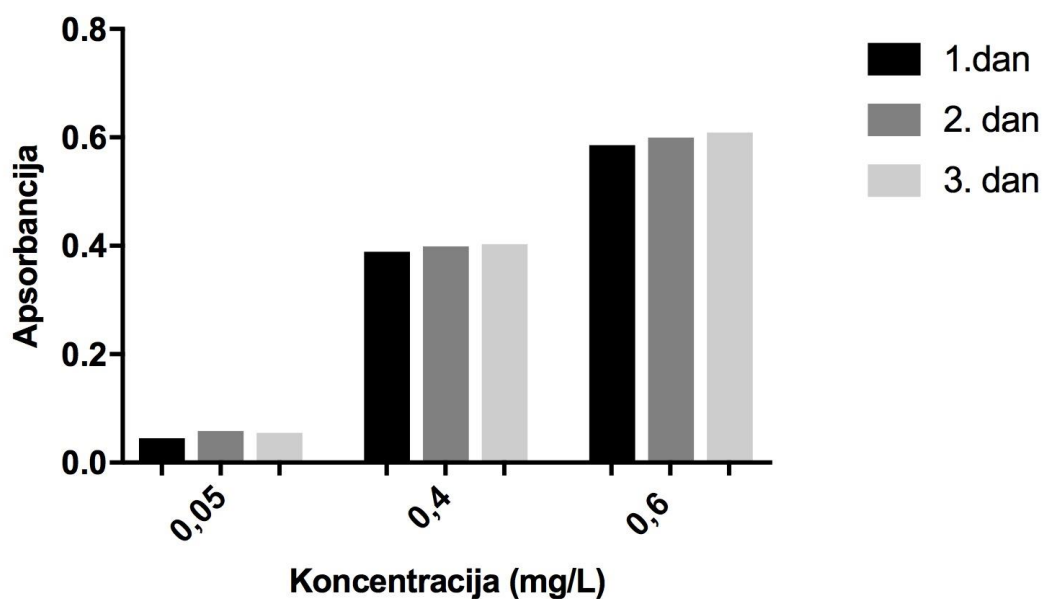
Slika 6. Graf ponovljivosti uzastopnih mjerenja izražen kao ovisnost apsorbancije o koncentraciji

Srednja preciznost utvrđena je mjerenjem vrijednosti koncentracija za tri standarda kroz tri dana. Dobivene vrijednosti RSD prikazane u Tablici 4. i grafom (Slika 7).

Tablica 4. Izmjerene koncentracije za tri standarda cinka kroz vremenski period od tri dana

BROJ MJERENJA	ST1 (0,05 mg/L)	ST4 (0,4 mg/L)	ST5 (0,6 mg/L)
1.	0,045	0,399	0,600
2.	0,058	0,389	0,586
3.	0,055	0,403	0,609
Srednja vrijednost (χ)	0,0527	0,397	0,5983
Standardna devijacija (SD)	0,0068	0,0072	0,0116
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	12,9244	1,8164	1,9371

Prihvatljiva relativna standardna devijacija (RSD, %) za srednju preciznost je do 3 %.



Slika 7. Graf ovisnosti apsorbancije o koncentraciji tri uzorka mjerena kroz tri dana

4.1.3. Točnost

Točnost označava slaganje srednje vrijednosti rezultata dobivenih analizom te stvarnih ili prihvaćenih referentnih vrijednosti, a izražava se preko analitičkog prinosa. Izračunava se prema formuli (5).

Da bi se odredila točnost ispitivane metode, izvršeno je pet mjerenja za dvije koncentracije standardnog referentnog materijala Randox.

Tablica 5. Izmjerene koncentracije za dva standarda cinka

BROJ MJERENJA	Randox 1	Randox 2
1.	33,1	27,10
2.	32,66	28,4
3.	32,11	28,02
4.	34,00	26,89
5.	35,04	30,84
Srednja vrijednost (\bar{x})	33,38	25,09
Sredina kontrole (X)	33,10	25,38
Analitički prinos (R, %)	100,85	103,81

Za Randox 1 referentni interval ima raspon od 26,5 do 39,7, a za Randox 2 raspon je od 21,7 do 32,5.

4.1.4. Osjetljivost

Utvrđeno je da je za ispitivanu metodu standardna devijacija σ jednaka $2,5398 \times 10^{-4}$, a nagib pravca a 0,1616. Vrijednosti su uvrštene u formule (3) i (4) te su dobiveni sljedeći rezultati:

$$\text{LOD} = 4,7151 \cdot 10^{-3} \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 1,5717 \cdot 10^{-2} \text{ mg/L.}$$

4.2. Primjena optimizirane metode

Ispitivana metoda korištena je za određivanje koncentracije cinka u urinu u tri uzorka sakupljena od dobrovoljnih darivatelja, trkača ultramaratona i to neposredno prije utrke. Rezultati analize su prikazani u Tablici 6.

Tablica 6. Koncentracije cinka u uzorcima ljudskog urina

BROJ MJERENJA	UZORAK 1 (mg/L)	UZORAK 2 (mg/L)	UZORAK 3 (mg/L)
1.	0,060	0,138	0,108
2.	0,061	0,141	0,113
3.	0,056	0,146	0,115
Srednja vrijednost	0,059	0,142	0,112
Relativna standardna devijacija (RSD, %)	4,484	2,853	3,219

5. ZAKLJUČAK

Metoda izložena u ovom diplomskom radu validirana je preko linearnosti, preciznosti, točnosti te osjetljivosti (granica dokzivanja i određivanja) kako bi bila pogodna za određivanje koncentracije cinka u urinu. Za ispitivanje parametara validacije korišteni su standardi cinka u rasponu koncentracija od 0,05 do 1 mg/L pripremljeni razrjeđivanjem komercijalnog standarda cinka koncentracije 1000 µg/L.

Linearnost je ispitana pripremom serije od sedam standarda cinka čije su koncentracije prikazane grafički u obliku kalibracijske krivulje u ovisnosti o vrijednostima dobivenih apsorbancija pri čemu je dobivena jednadžba pravca $y = 0,1616x - 0,0006$ s koeficijentom korelacije $R^2 = 1$ iz čije se vrijednosti zaključuje da je metoda linearna.

Preciznost je ispitana preko ponovljivosti i srednje preciznosti mjerenjem koncentracija triju standarda: ST1 koncentracije 0,05 mg/L, ST4 koncentracije 0,4 mg/L i ST5 koncentracije 0,6 mg/L. Za ponovljivost su dobivene sljedeće vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD, %): ST1 = 7,6695%, ST4 = 0,9476% i ST5 = 0,4348%. Dopuštena relativna standardna devijacija za ponovljivost je do 2 %. Dobivene vrijednosti pokazuju da za standard 1, koji je u najnižoj koncentraciji, RSD nije zadovoljavajuća, dok je u ostala dva standarda zadovoljavajuća. Za mjerenje srednje preciznosti korišteni su isti standardi, a dobivene vrijednosti su: ST1 = 12,9244 %, ST4 = 1,8164 % i ST5 = 1,9371 %. Dopuštena relativna standardna devijacija za srednju preciznost iznosi do 3 %. Kao i kod ponovljivosti, standard najniže koncentracije ne zadovoljava, dok ostali standardi zadovoljavaju. Zbog niske koncentracije ST1 nije neuobičajeno odstupanje rezultata.

Točnost je ispitana pomoću standardnih referentnih uzoraka Randox 1 i Randox 2. Vrijednost analitičkog prinosa za Randox 1 iznosi 100,85 %, a za Randox 2 103,81 % što ukazuje na prihvatljivu točnost metode.

Osjetljivost je izražena preko granice dokazivanja i granice određivanja čije su vrijednosti $LOD = 4,7151 \times 10^{-3}$ mg/L i $LOQ = 1,5717 \times 10^{-2}$ mg/L što upućuje na vrlo osjetljivu metodu pošto su dobivene vrijednosti puno niže u odnosu na normalne koncentracije u urinu.

Primjena validirane metode na uzorcima ljudskog urina pokazala je da je metoda prikladna. Vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD, %) nisu veće od 5 %. Za uzorak 1 vrijednost je 4,484 %, za uzorak 2 2,853 %, a za uzorak 3 3,219 %. Metoda je relativno jednostavna, jeftina i brza te omogućuje screening uzoraka, a urin je, kao uzorak, jednostavnije prikupiti nego krv.

6. LITERATURA

1. Atomic Absorption Spectrometer, 2017, URL: <http://lab-training.com/2013/05/08/introduction-to-aas-component-parts/>, pristupljeno 17.07.2018.
2. Ata S, Wattoo FH, Ahmed M , Wattoo MHS , Tirmizi SA , Wadood A. A method optimization study for atomic absorption spectrophotometric determination of total zinc in insulin using direct aspiration technique. *Alexandria Med J*, 2015, 51, 19–23.
3. Guo CH, Cheng PC, Yeh MS, Hsiung DY, Wang CL. Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clin Biochem*, 2011, 44, 275-280.
4. Hambidge M. Human Zinc Deficiency. *J Nutr*, 2000, 130(5), 1344S–1349S.
5. Kirkbright GF. Atomic absorption spectroscopy. U: Elemental analysis of biological materials: current problems and techniques with special reference to trace elements. Vienna, 1980, str 141-164.
6. Jablan J, Inić S, Stosnach H, Ortner Hadžiabdić M, Vujić L, Domijan AM. Level of minerals and trace elements in the urine of the participants of mountain ultra-marathon race. *J Trace Elem Med Biol*, 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.02.004>
7. Jignesh S, Vineeta K, Abhay S, Vilasrao K. Analytical methods for estimation of metals. *Int J Res Pharm Chem*, 2012, 2(1), 146-149.
8. Jurowski K, Szewczyk B, Nowak G, Piekoszewski W. Biological consequences of zinc deficiency in the pathomechanisms of selected diseases. *J Biol Inorg Chem*. 2014, 19, 1069–1079.
9. Lewis MR, Kokan L. Zinc Gluconate: Acute ingestion. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1998, 36(1-2), 99-101.
10. Mezzetti A, Pierdomenico SD, Costantini F, Romano F, De Cesare D, Cuccurullo F, Imbustaro T, Riario-Sforza G, Di Giacomo F, Zuliani G, Fellin R. Copper/zinc ratio and systemic oxidant load: effect of aging and aging-related degenerative diseases. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25, 6, 676–681.
11. Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković Rodriguez J, Mornar Turk A, Sertić M. Analitika lijekova – Praktikum. Zagreb, Farmaceutsko biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2014, str. 135-137.

12. Osredkar J, Sustar N. Copper and Zinc. Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clinic Toxicol*, 2011, S3:001, 1-8.
13. Prashanth L, Kattapagari KK, Chitturi RT, Baddam VRR, Prasad LK. A review on role of essential trace elements in health and disease. *J Dr NTR Univ Health Sci*, 2015, 4(2), 75-79.
14. Skoog DA, Leary JJ. An introduction to optical atomic spectrometry. U: Principles of Instrumental Analysis, 4th edition. Sauder College Publishing, Philadelphia, 1992, str. 196-210.
15. Skoog DA, West DM, Holler FJ. Atomska spektroskopija temeljena na ultraljubičastom i vidljivu zračenju. U: Fundamentals of analytical chemistry, 6th edition. Prevoditelji: Kujundžić N, Živčić-Alegretti, Živković A. Zagreb, Školska knjiga, 1999, str. 595-620.
16. Tang SX, Yu XZ, Wu CN. Comparison of the Levels of Five Heavy Metals in Human Urine and Sweat after Strenuous Exercise by ICP-MS. *J Appl Math Phys*, 2016, 4, 183-188.
17. Watson DG. Atomic absorption spectrophotometry. U: Pharmaceutical Analysis. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1999, str. 125-132.
18. WHO. Zinc. U: Environmental Health Criteria 221. 2001, str. 246-257.
19. Williams, TR. Analytical methods for atomic absorption spectrophotometry. *J Chem Educ*, 1972, 49(4), A250.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

7.1. SAŽETAK

Cink je esencijalni metal u tragovima koji je od velike važnosti za normalnu funkciju organizma. Važan je kao sastavnica proteina, posebice enzima, ali i u održavanju homeostaze brojnih organa i organskih sustava. Njegova antioksidativna svojstva usporavaju proces starenja i razvoj degenerativnih bolesti. Cink se, između ostalih tvari, izlučuje u urin tijekom fizičke aktivnosti i zato je mjerenje njegove koncentracije potencijalno važan parametar za praćenje tijekom istih. Jedna od metoda za određivanje koncentracije cinka je atomsko apsorpcijska spektrofotometrija.

U ovom radu metoda je validirana preko linearnosti, preciznosti, točnosti te osjetljivosti (granica dokzivanja i određivanja) s ciljem razvoja metode pogodne za određivanje koncentracije cinka u urinu.

Mjerenjem koncentracija serije od sedam standarda cinka dobivena je kalibracijska krivulja jednadžbe pravca $y = 0,1616x - 0,0006$ s koeficijentom korelacije $R^2 = 1$ iz čije se vrijednosti zaključuje da je metoda linearna.

Preciznost je ispitana na tri koncentracijestandarda: 0,05 mg/L (ST1), 0,4 mg/L (ST4) i 0,6 mg/L (ST5). Vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD, %) za ponovljivost su: ST1 = 7,6695 %, ST4 = 0,9476 % i ST5 = 0,4348 %. Mjerenjem srednje preciznosti dobivene vrijednosti su: ST1 = 12,9244 %, ST4 = 1,8164 % i ST5 = 1,9371 %. Dopuštena RSD za ponovljivost iznosi do 2 %, a za srednju preciznost do 3 %. Ponovljivost i srednja preciznost bile su zadovoljavajuće za više koncentracije standarda, dok za najnižu koncentraciju nisu zadovoljavale, što nije neuobičajeno za vrlo niske koncentracije analita.

Točnost je ispitana pomoću standardnih referentnih uzoraka Randox 1 i Randox 2. Dobivene vrijednosti analitičkih prinosa su: Randox 1 = 100,85 % i Randox 2 = 103,81 % što ukazuje na prihvatljivu točnost metode.

Osjetljivost je izražena preko granice dokazivanja i granice određivanja čije niske vrijednosti, $LOD = 4,7151 \times 10^{-3}$ mg/L i $LOQ = 1,5717 \times 10^{-2}$ mg/L, upućuju na vrlo osjetljivu metodu pošto su dobivene vrijednosti puno niže u odnosu na normalne koncentracije u urinu.

Primjena validirane metode na uzorcima ljudskog urina pokazala je da je metoda prikladna ($RSD < 5$ %).

7.2. SUMMARY

Zinc is an essential trace element of utmost importance for preserving the normal function of human organism. It is vital as a component of proteins, especially enzymes, but also in maintaining homeostasis of a large number of organs and organ systems. Its antioxydant properties are responsible for slowing down the process of aging and progress of degenerative diseases. Zinc is, among other substances, excreted in urine during physical activity; therefore, measuring its concentration is potentially an important parameter to observe during such activities. One of the methods for determination of zinc concentration is atomic absorption spectrophotometry.

In this thesis, the method was validated through linearity, precision, accuracy and limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) with the goal of developing a method suitable for determination of zinc concentration in urine samples.

Measuring the concentrations of a series of seven zinc standards a graphical representation of 'concentration' versus 'absorbance' was made. Its equation is $y = 0,1616x - 0,0006$ with the correlation coefficient of $R^2 = 1$, which indicates that the method is linear.

Precision was measured using three standards: 0,05 mg/L (ST1), 0,4 mg/L (ST4) and 0,6 mg/L (ST5). Relative standard deviations (RSD, %) for repeatability were: ST1 = 7,6695 %, ST4 = 0,9476 % and ST5 = 0,4348 %, and for intermediate precision: ST1 = 12,9244 %, ST4 = 1,8164 % and ST5 = 1,9371 %. Allowed RSD for repeatability and intermediate precision is less than 2 % and 3%, respectively. Collected results were acceptable for higher concentration standards ST4 and ST5, and not acceptable for ST1 which is not uncommon for low concentration samples.

Accuracy was analysed using the standard referent samples Randox 1 and Randox 2. Recovery values were: Randox 1 = 100,85 % and Randox 2 = 103,81 % which implies acceptable accuracy of the method.

Measured limit of detection was $4,7151 \times 10^{-3}$ mg/L and limit of quantification $1,5717 \times 10^{-2}$ mg/L. These results indicate a highly sensitive method since values of LOD and LOQ are much lower compared to zinc urine concentrations.

The application of the validated method on samples of human urine showed that the method is suitable for the intended purpose ($RSD < 5\%$).

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za analitičku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

OPTIMIZIRANJE METODE ZA ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE CINKA U LJUDSKOM URINU

Ana-Marija Berić

SAŽETAK

Cink je esencijalni metal u tragovima koji je od velike važnosti za normalnu funkciju organizma. Važan je kao sastavnica proteina, posebice enzima, ali i u održavanju homeostaze brojnih organa i organskih sustava. Njegova antioksidativna svojstva usporavaju proces starenja i razvoj degenerativnih bolesti. Cink se, između ostalih tvari, izlučuje u urin tijekom fizičke aktivnosti i zato je mjerenje njegove koncentracije potencijalno važan parametar za praćenje tijekom istih. Jedna od metoda za određivanje koncentracije cinka je atomska apsorpcijska spektrofotometrija. U ovom radu metoda je validirana preko linearnosti, preciznosti, točnosti te osjetljivosti (granica dokazivanja i određivanja) s ciljem razvoja metode pogodne za određivanje koncentracije cinka u urinu. Mjerenjem koncentracija serije od sedam standarda cinka dobivena je kalibracijska krivulja jednadžbe pravca $y = 0,1616x - 0,0006$ s koeficijentom korelacije $R^2 = 1$ iz čije se vrijednosti zaključuje da je metoda linearna. Preciznost je ispitana na tri koncentracijestandarda: 0,05 mg/L (ST1), 0,4 mg/L (ST4) i 0,6 mg/L (ST5). Vrijednosti relativne standardne devijacije (RSD, %) za ponovljivost su: ST1 = 7,6695 %, ST4 = 0,9476 % i ST5 = 0,4348 %. Mjerenjem srednje preciznosti dobivene vrijednosti su: ST1 = 12,9244 %, ST4 = 1,8164 % i ST5 = 1,9371 %. Dopusštena RSD za ponovljivost iznosi do 2 %, a za srednju preciznost do 3 %. Ponovljivost i srednja preciznost bile su zadovoljavajuće za više koncentracije standarda, dok za najnižu koncentraciju nisu zadovoljavale, što nije neuobičajeno za vrlo niske koncentracije analita. Točnost je ispitana pomoću standardnih referentnih uzoraka Randox 1 i Randox 2. Dobivene vrijednosti analitičkih prinosa su: Randox 1 = 100,85 % i Randox 2 = 103,81 % što ukazuje na prihvatljivu točnost metode. Osjetljivost je izražena preko granice dokazivanja i granice određivanja čije niske vrijednosti, LOD = $4,7151 \times 10^{-3}$ mg/L i LOQ = $1,5717 \times 10^{-2}$ mg/L, upućuju na vrlo osjetljivu metodu pošto su dobivene vrijednosti puno niže u odnosu na normalne koncentracije u urinu. Primjena validirane metode na uzorcima ljudskog urina pokazala je da je metoda prikladna (RSD < 5 %).

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 35 stranica, 7 slika, 6 tablica i 19 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: cink, atomska apsorpcijska spektrofotometrija, validacija metode

Mentor: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Suzana Inić, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Živka Juričić, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan, 2018.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Analytic Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

OPTIMIZATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF ZINC IN HUMAN URINE

Ana-Marija Berić

SUMMARY

Zinc is an essential trace element of utmost importance for preserving the normal function of human organism. It is vital as a component of proteins, especially enzymes, but also in maintaining homeostasis of a large number of organs and organ systems. Its antioxydant properties are responsible for slowing down the process of aging and progress of degenerative diseases. Zinc is, among other substances, excreted in urine during physical activity; therefore, measuring its concentration is potentially an important parameter to observe during such activities. One of the methods for determination of zinc concentration is atomic absorption spectrophotometry. In this thesis, the method was validated through linearity, precision, accuracy and limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) with the goal of developing a method suitable for determination of zinc concentration in urine samples. Measuring the concentrations of a series of seven zinc standards a graphical representation of 'concentration' versus 'absorbance' was made. Its equation is $y = 0,1616x - 0,0006$ with the correlation coefficient of $R^2 = 1$, which indicates that the method is linear. Precision was measured using three standards: 0,05 mg/L (ST1), 0,4 mg/L (ST4) and 0,6 mg/L (ST5). Relative standard deviations (RSD, %) for repeatability were: ST1 = 7,6695 %, ST4 = 0,9476 % and ST5 = 0,4348 %, and for intermediate precision: ST1 = 12,9244 %, ST4 = 1,8164 % and ST5 = 1,9371 %. Allowed RSD for repeatability and intermediate precision is less than 2 % and 3%, respectively. Collected results were acceptable for higher concentration standards ST4 and ST5, and not acceptable for ST1 which is not uncommon for low concentration samples. Accuracy was analysed using the standard referent samples Randox 1 and Randox 2. Recovery values were: Randox 1 = 100,85 % and Randox 2 = 103,81 % which implies acceptable accuracy of the method. Measured limit of detection was $4,7151 \times 10^{-3}$ mg/L and limit of quantification $1,5717 \times 10^{-2}$ mg/L. These results indicate a highly sensitive method since values of LOD and LOQ are much lower compared to zinc urine concentrations. The application of the validated method on samples of human urine showed that the method is suitable for the intended purpose (RSD < 5 %).

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 35 pages, 7 figures, 6 tables, and 19 references. Original is in Croatian language.

Keywords: zinc, atomic absorption spectrophotometry, validation of analytical method

Mentor: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Jasna Jablan, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Živka Juričić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September, 2108.